Machine Translated by Google

SCIENTIFIC REPORTS

ÅBEN

Mælkesyrebakterier beskytter *Caenorhabditis elegans* fra Toksicitet af grafenoxid ved Opretholdelse af normal tarmfunktion Permeabilitet under forskellige Genetiske baggrunde

modtaget: 12. august 2015
accepteret: 27. oktober 2015
Udgivet: 27. november 2015

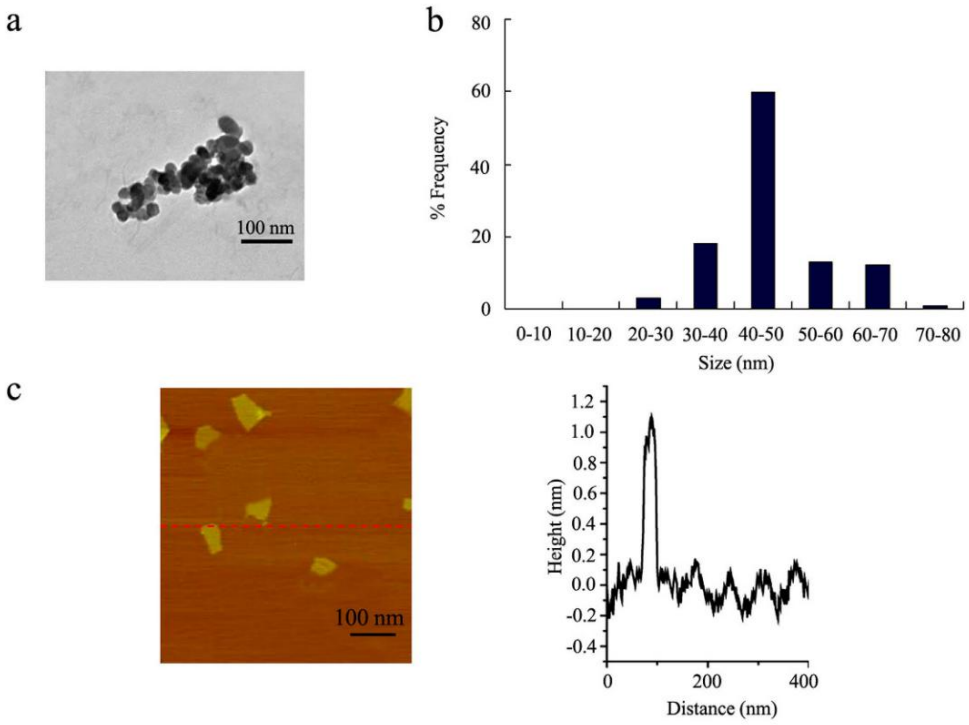
Yunli Zhao1,2, XiaomingYu1, Ruhan Jia1, RuilongYang1,3, Qi Rui3 & Dayong Wang1

Mælkesyrebakterier (LAB) er sikre og nyttige til fermentering af fødevarer og foder. Vi anvendte *Caenorhabditis elegans* til at undersøge den mulige gavnlige effekt af forbehandling med LAB *(Lactobacillus bulgaricus)* mod toksiciteten af grafenoxid (GO) og de underliggende mekanismer. LAB forhindrede GO-toksicitet på funktionerne af både primære og sekundære målrettede organer i vildtype nematoder. LAB blokerede translokation af GO til sekundære målrettede organer gennem tarmbarrieren ved at opretholde normal intestinal permeabilitet i vildtype nematoder. Desuden forhindrede LAB GO-skade på funktionerne af både primære og sekundære målrettede organer i eksponerede nematoder med mutationer af modtagelige gener *(sod-2, sod-3, gas-1* og *aak-2)* for GO-toksicitet ved at opretholde normal intestinal permeabilitet. LAB opretholdt også normal afføringsadfærd i både vildtype nematoder og nematoder med mutationer af modtagelige gener. Derfor kan den gavnlige rolle af LAB mod GO-toksicitet under forskellige genetiske baggrunde skyldes de kombinerede effekter på intestinal permeabilitet og afføringsadfærd. Desuden var de gavnlige virkninger af LAB mod GO-toksicitet afhængig af funktionen af ACS-22, som er homolog med pattedyrs-FATP4. Vores undersøgelse belyser etableringen af en farmakologisk strategi til at beskytte

Grafenoxid (GO), et medlem af grafen, er et enkeltatoms tykt lag af sp2 -bundne kulstofatomer i et tæt pakket todimensionelt gitter af bikageform med unikke fysiske, kemiske, elektriske og mekaniske egenskaber1 . Selvom GO potentielt kan anvendes i biomedicin, herunder lægemiddelafgivelse, billeddannelse og fotokatalysatorer2-4, har nogle undersøgelser vist de negative virkninger af GO på menneskers sundhed og miljøorganismer4,5. Udover in vitro-toksiciteten6-8 har eksponering for GO også ført til en række in vivo-toksiciteter, såsom lungetoksicitet og reproduktionstoksicitet hos pattedyr4,9,10,11. Det blev også rapporteret, at eksponering for GO kan resultere i genotoksicitet på organismer12,13. Desuden blev det rapporteret, at eksponering for GO kan forårsage en forøgelse af villuslængden og -bredden i tolvfingertarmregionerne, hvilket antyder de ombyggede tarmvilli14. Indtil videre er flere cellulære mekanismer blevet fremført for at forklare GO-toksiciteten: (1) direkte kontaktinteraktion mellem ultraskarpe kanter af GO og cellemembranen15,16, (2) in

[1]Nøglelaboratorium for miljømedicinsk teknik i Undervisningsministeriet, Medicinsk Fakultet, Sydøstuniversitetet, Nanjing 210009, Kina. 2 Institut for forebyggende medicin, Bengbu Medical College, Bengbu 233020, Kina. 3 College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Kina. Korrespondance og anmodninger om materialer skal rettes til DW (e-mail: dayongw@seu.edu.cn)

Machine Translated by Google
www.nature.com/videnskabeligerapporter/



Figur 1. Fysiokemisk karakterisering af GO. (a) TEM-billede af GO efter sonikering. **(b)** Størrelsesfordeling af GO i K-medium efter sonikering. **(c)** AFM-analyse af GO.

produktion af reaktive iltarter (ROS)17,18, og (3) indpakning af celler eller mikroorganismer og aggregering i dyrkningsmediet19,20 .

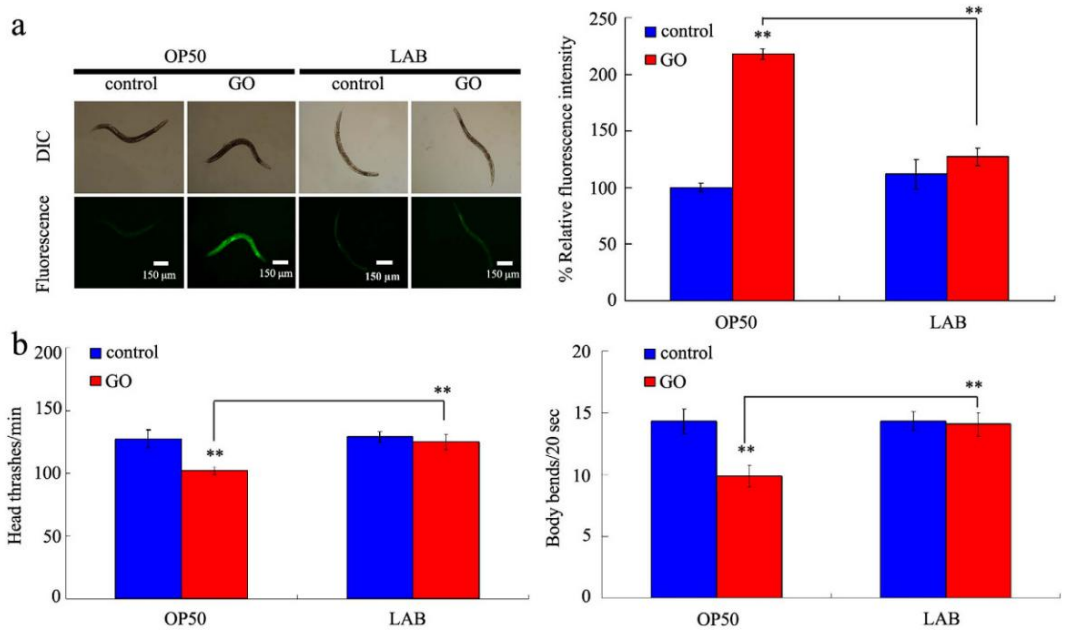
Caenorhabditis elegans, en fritlevende og rigelig jordnematode, er velkarakteriseret strukturelt og genetisk21,22. De bevarede egenskaber ved basale fysiologiske processer, signalveje, genetisk kontrol og stressresponser mellem C. elegans og pattedyr eller mennesker gør C. elegans til en nyttig alternativ ikke-pattedyrs toksicitetsassaymodel5,23 . I C. elegans kan konstruerede nanomaterialer (ENM'er) translokeres til de primære målrettede organer (såsom tarmen) og/eller de sekundære målrettede organer (såsom neuroner og reproduktionsorganer)24-27. Desuden har vores tidligere undersøgelse indikeret den afgørende rolle, som den biologiske barriere i tarmen spiller mod den mulige toksicitet fra ENM'er i nematoder28.
Strukturelt indeholder tarmen det apikale domæne, inklusive børstegrænsen og den terminale web, det basolaterale domæne og de apikale forbindelser, der forbinder en enterocyt med dens partner og med tilstødende enterocytter29. Hos C. elegans er tarmen det organ, der er ansvarlig for fordøjelse af fødevarer, assimilering og metabolisme af makromolekyler, afføring og stressrespons29. Det motoriske program, der finder sted i tarmen, deltager i kontrollen af afføringsadfærd29. C. elegans kan med succes anvendes til toksicitetsvurdering og toksikologisk undersøgelse af kulstofbaserede ENM'er såsom grafit, flervæggede kulstofnanorør (MWCNT'er) og fullerenol30-33. Tidligere undersøgelser har yderligere vist, at eksponering for GO kan resultere i toksicitet på funktionerne af både primære (såsom tarm) og sekundære (såsom neuroner og reproduktionsorganer) målrettede organer i nematoder34-36. Derudover kan den observerede GO-toksicitet i høj grad skyldes de kombinerede virkninger af oxidativ stress, forringet tarmbarriere og forlænget afføringscykluslængde hos nematoder37.

For at reducere toksiciteten af GO, udover de kemiske modifikationer38,39, er det for nylig blevet yderligere indikeret, at specifik farmakologisk administration kan anvendes til at modvirke nanotoksiciteten40,41. Mælkesyrebakterier (LAB) er en potentiel probiotisk bakterie og betragtes generelt som sikker og nyttig til fermentering af fødevarer og foder42. Hos C. elegans kan fodring med specifikke LAB-stammer være resistent over for patogen infektion43,44. Vi antager, at administration med LAB kan være nyttig til at opretholde den funktionelle tilstand af tarmbarrieren for at modvirke toksiciteten af GO i nematoder.
I den foreliggende undersøgelse anvendte vi derfor in vivo C. elegans-analysesystemet til at undersøge den mulige gavnlige effekt af LAB mod GO-toksiciteten og de underliggende mekanismer. Vores undersøgelse vil give indsigt i etableringen af en farmakologisk strategi for at beskytte tarmbarrieren mod GO's negative virkninger i organismer.

Resultater

Fysisk-kemiske egenskaber af fremstillet GO. Størrelsen af det meste af GO'et i K-medium efter sonikering (40 kHz, 100 W, 30 min) var i området 40-50 nm (fig. 1a, b). GO-aggregeringsstørrelsen var 274 ± 72 nm (fig. 1a). Resultaterne af atomkraftmikroskopi (AFM) for GO antyder dets enlagsegenskab.

Machine Translated by Google
www.nature.com/videnskabeligerapporter/



Figur 2. LAB-administration forhindrede GO's toksicitet i vildtype nematoder. (a) LAB-administration forhindrede induktion af intestinal ROS-produktion induceret af GO-eksponering i vildtype nematoder. **(b)** LAB-administration forhindrede GO's toksicitet på bevægelsesadfærd i vildtype nematoder. Bevægelsesadfærd blev vurderet ud fra endepunkterne hovedstød og kropsbøjning. GO-eksponeringskoncentrationen var 100 mg/L. Den anvendte LAB-stamme var L. bulgaricus. L4-larver blev forbehandlet med LAB i 12 timer og derefter eksponeret for GO i 24 timer ved 20 °C. Søjlerne repræsenterer gennemsnit ± SEM **P < 0,01 vs.

kontrollere.

(Fig. 1c). Højdebilledet fra AFM-assayet indikerer, at tykkelsen af det fremstillede GO var omkring 1,0 nm i topografisk højde (Fig. 1c). Zeta-potentialet for GO var -20,3 ± 1,6 mV. Raman-spektroskopimålinger antydede introduktion af uorden i grafitlaget (Fig. S1). GO havde et G-bånd ved 1597 cmÿ¹ og et D-bånd ved 1352 cmÿ¹ (Fig. S1).

Røntgenfotoelektronspektrumanalyse (XPS) indikerer yderligere, at GO havde et C/O-forhold på 2,32 (fig. S2). Bindingsenergien for C= C og CC er angivet til 284,6 eV, 286,7 eV for CO og 288,8 eV for O= C (fig. S2). Indholdet af COOH i GO er 2,13%, og indholdet af OH-gruppen i GO er 50,35% (fig. S2).

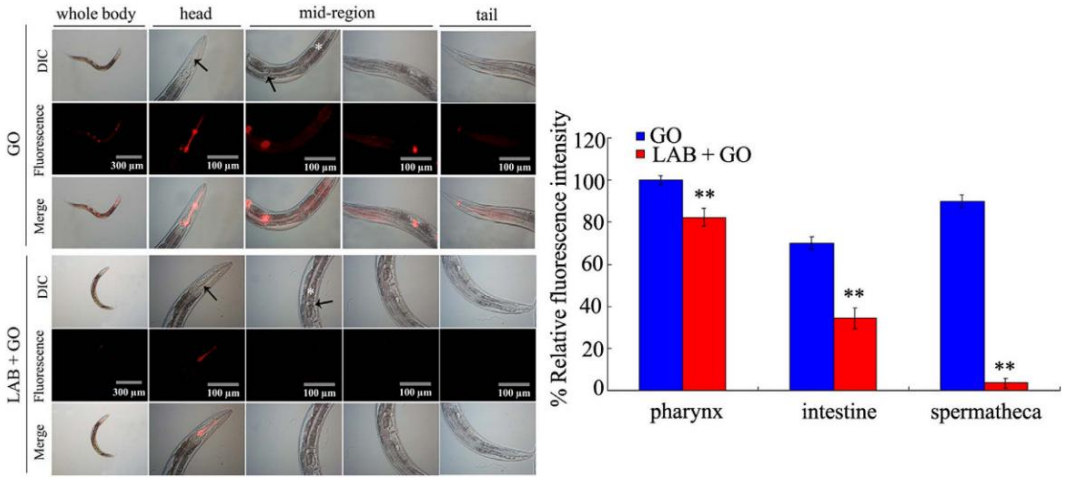
Administration med LAB forhindrede GO's toksicitet på vildtype nematoder. For at bestemme effekten af LAB-administration på GO's toksicitet på funktionerne af primære målrettede organer valgte vi endepunktet for produktion af reaktive iltarter (ROS) i tarmen45. Tidligere undersøgelser har antydet, at akut eksponering for 100 mg/L GO forårsagede negative virkninger på funktionerne af både primære og sekundære målrettede organer i nematoder37. Akut eksponering for GO (100 mg/L) inducerede en signifikant intestinal ROS-produktion sammenlignet med kontrol i vildtype nematoder (fig. 2a). I modsætning hertil hæmmede forbehandling med LAB (L. bulgaricus) signifikant induktionen af intestinal ROS-produktion (fig. 2a). LAB-behandling alene inducerede ikke den mærkbare intestinale ROS-produktion i vildtype nematoder (fig. 2b).

For at bestemme effekten af LAB-administration på GO's toksicitet på funktionerne af sekundære målrettede organer, valgte vi endepunkterne for hoved-thrash og kropsbøjning, som afspejler nematodernes bevægelsesadfærd32. Akut eksponering for GO (100 mg/L) reducerede signifikant hoved-thrash eller kropsbøjning hos nematoder sammenlignet med kontrol hos vildtype nematoder (fig. 2b). Forbehandling med LAB undertrykte signifikant faldet i hoved-thrash eller kropsbøjning observeret hos GO (100 mg/L) eksponerede vildtype nematoder (fig. 2b). LAB-behandling alene påvirkede ikke åbenlyst bevægelsesadfærden hos vildtype nematoder (fig. 2b). Disse resultater tyder på, at forbehandling med LAB kan være gavnlig for at modvirke de toksiske virkninger af GO på funktionerne af både primære og sekundære målrettede organer i vildtype nematoder.

Administration med LAB ændrede translokationsmønsteret af GO i vildtype nematoder. Distribution eller translokation er det centrale cellulære grundlag for toksicitetsdannelse af ENM'er, inklusive GO, i nematoder5

Efter eksponering kunne GO fordeles i både de primære målrettede organer såsom tarm og svælg og de sekundære målrettede organer såsom sperm-mathecas reproduktionsorgan i vildtype nematoder (fig. 3). Dette GO-translokationsmønster blev dog tydeligvis ændret ved forbehandling med LAB. Efter forbehandling med LAB var GO hovedsageligt fordelt i svælget og

Machine Translated by Google
www.nature.com/videnskabeligerapporter/



Figur 3. GO-fordeling i vildtype-nematoder. GO-Rho B blev brugt til at visualisere fordelingen af GO i nematoder. Pilespidserne angiver henholdsvis svælget og spermatheca i hovedregionen eller midterregionen af nematoder. Tarmen **(*)** i midterregionen blev også angivet. GO-Rho B-eksponeringskoncentrationen var 100 mg/L. Den anvendte LAB-stamme var L. bulgaricus. L4-larver blev forbehandlet med LAB i 12 timer og derefter eksponeret for GO-Rho B i 24 timer ved 20 °C. Søjlerne repræsenterer middelværdier ± SEM **P < 0,01 vs. GO.

tarmen, og der blev ikke detekteret signaler i de sekundære målrettede organer hos vildtype nematoder (fig. 3). Sammenlignet med fordelingen af GO-Rho B i vildtype nematoder forårsagede eksponering for Rho B en relativt ligelig fordeling af fluorescens i væv fra vildtype nematoder (fig. S3).

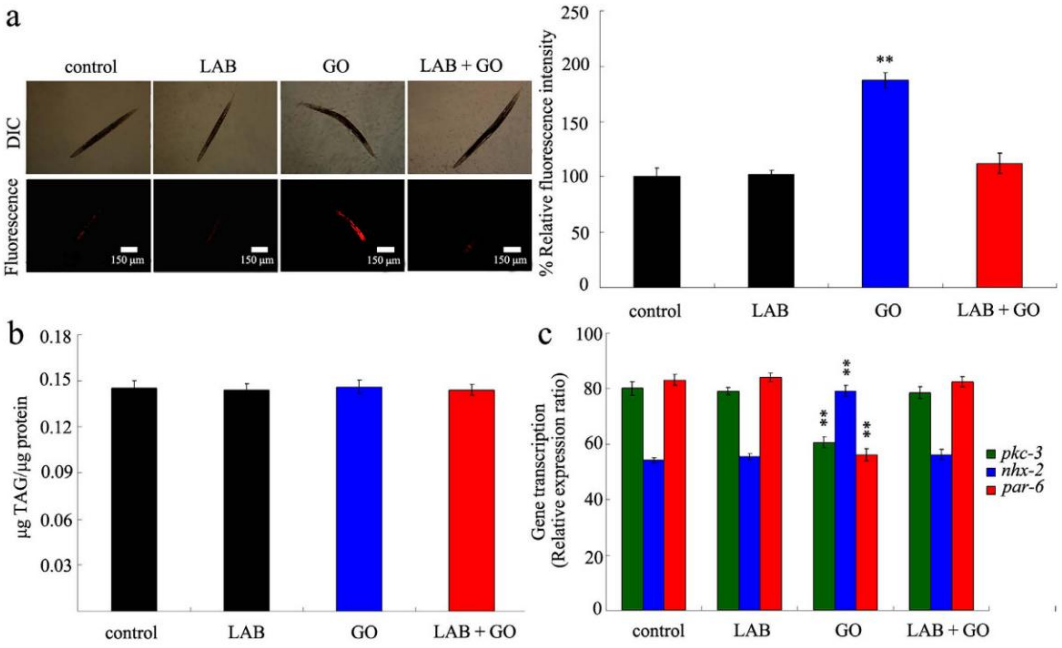
Administration med LAB var nyttig til at opretholde den normale tilstand af intestinal permeabilitet i GO-eksponerede vildtype nematoder. For at bestemme den underliggende cellulære mekanisme for ændret translokationsmønster af GO i LAB-forbehandlede nematoder undersøgte vi yderligere permeabiliteten af primære målrettede organer for GO-eksponerede nematoder. Vi udforskede det lipofile fluorescerende farvestof, Nile Red, til at farve GO-eksponerede nematoder. LAB-forbehandling alene påvirkede ikke tydeligt fluorescensintensiteten af Nile Red i tarmen hos vildtype nematoder (fig. 4a). Vi fandt dog, at eksponering for GO (100 mg/L) inducerede den signifikant forbedrede fluorescensintensitet af Nile Red i tarmen sammenlignet med kontrol i vildtype nematoder (fig. 4a). I modsætning hertil blokerede forbehandling med LAB mærkbart stigningen i fluorescensintensiteten af Nile Red i tarmen hos vildtype nematoder (fig. 4a). I betragtning af at Nile Red også kan bruges til at mærke fedtopbevaring46, analyserede vi yderligere triglyceridindholdet i nematoder. LAB-forbehandling eller GO (100 mg/L) eksponering påvirkede ikke triglyceridindholdet signifikant sammenlignet med kontrolgruppen i vildtype nematoder (fig. 4b). Efter LAB-forbehandling udviste de GO (100 mg/L) eksponerede vildtype nematoder også et lignende triglyceridindhold som i kontrolgruppen af vildtype nematoder (fig. 4b). Disse resultater tyder på, at LAB-forbehandling potentielt kan blokere dannelsen af en hyperpermeabel tarmbarriere i GO-eksponerede nematoder.

Tidligere undersøgelser har vist, at eksponering for GO kan dysregulere ekspressionen af visse gener, der kræves for at kontrollere tarmudviklingen, såsom pkc-3-, nhx-2- og par-6-gener37. I C. elegans koder pkc-3-genet for en atypisk proteinkinase, nhx-2-genet koder for en natrium/proton-bytter, og par-6-genet koder for et PDZ-domæneholdigt protein. pkc-3-, nhx-2- og par-6-gener er nødvendige for at kontrollere udviklingen af intestinale mikrovilli i nematoder29. LAB-forbehandling alene påvirkede ikke signifikant ekspressionsmønstrene for pkc-3-, nhx-2- og par-6-gener i vildtype-nematoder (fig. 4c).
Eksponering for GO (100 mg/L) reducerede ekspressionsniveauerne af pkc-3- og par-6-generne signifikant og øgede ekspressionsniveauet af nhx-2-genet i vildtype nematoder (fig. 4c). I modsætning hertil hæmmede forbehandling med LAB tydeligvis faldet i ekspressionsniveauerne af pkc-3- og par-6-generne og undertrykte stigningen i ekspressionsniveauet af nhx-2-genet i vildtype nematoder (fig. 4c).

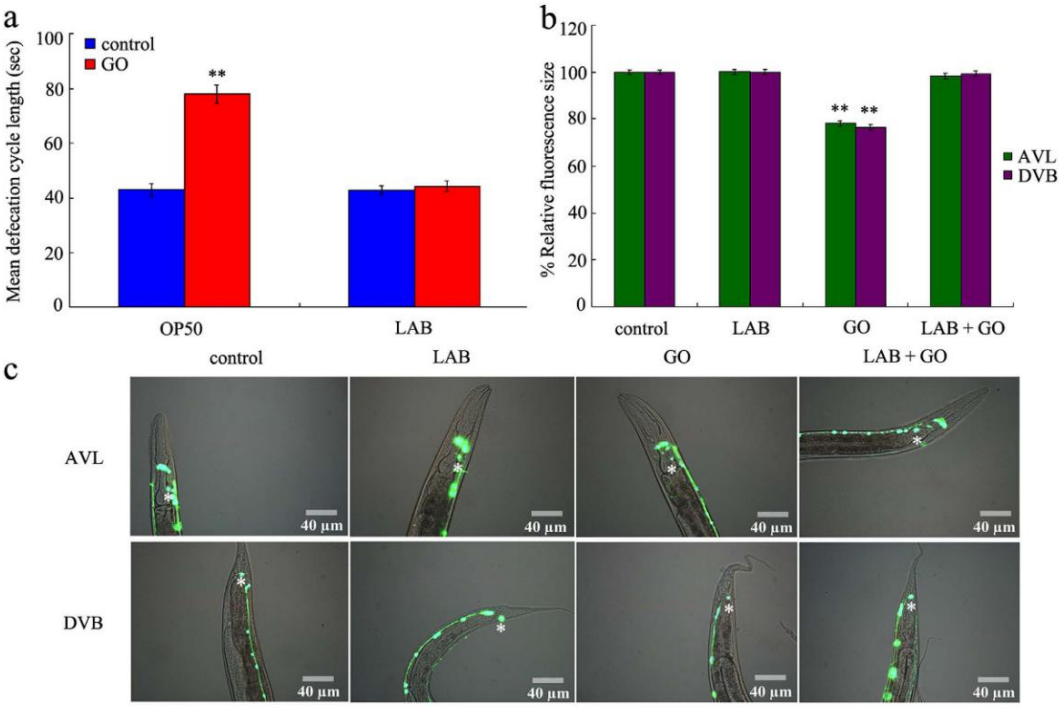
Administration med LAB opretholdt den normale afføringsadfærd hos GO-eksponerede vildtype nematoder. Hos C. elegans er dannelsen af unormal afføringsadfærd, udover induktionen af en hyperpermeabel tarmbarriere, et andet vigtigt cellulært grundlag for ENMs5's toksicitet. Eksponering for GO (100 mg/L) øgede signifikant den gennemsnitlige afføringscykluslængde for vildtype nematoder (fig. 5a). I modsætning hertil genvandt LAB-forbehandling mærkbart den toksiske effekt af GO (100 mg/L) på afføringsadfærd hos vildtype nematoder (fig. 5a). LAB-forbehandling alene påvirkede ikke åbenlyst afføringsadfærden (fig. 5a).

I C. elegans er AVL- og DVB-neuroner involveret i kontrollen af afføringsadfærd25. Eksponering for GO (100 mg/L) reducerede signifikant den relative fluorescensstørrelse af cellekroppen for AVL- eller DVB-neuroner (fig. 5b, c). I modsætning hertil undertrykte LAB-forbehandling markant reduktionen i relativ fluorescens.

Machine Translated by Google
www.nature.com/videnskabeligerapporter/

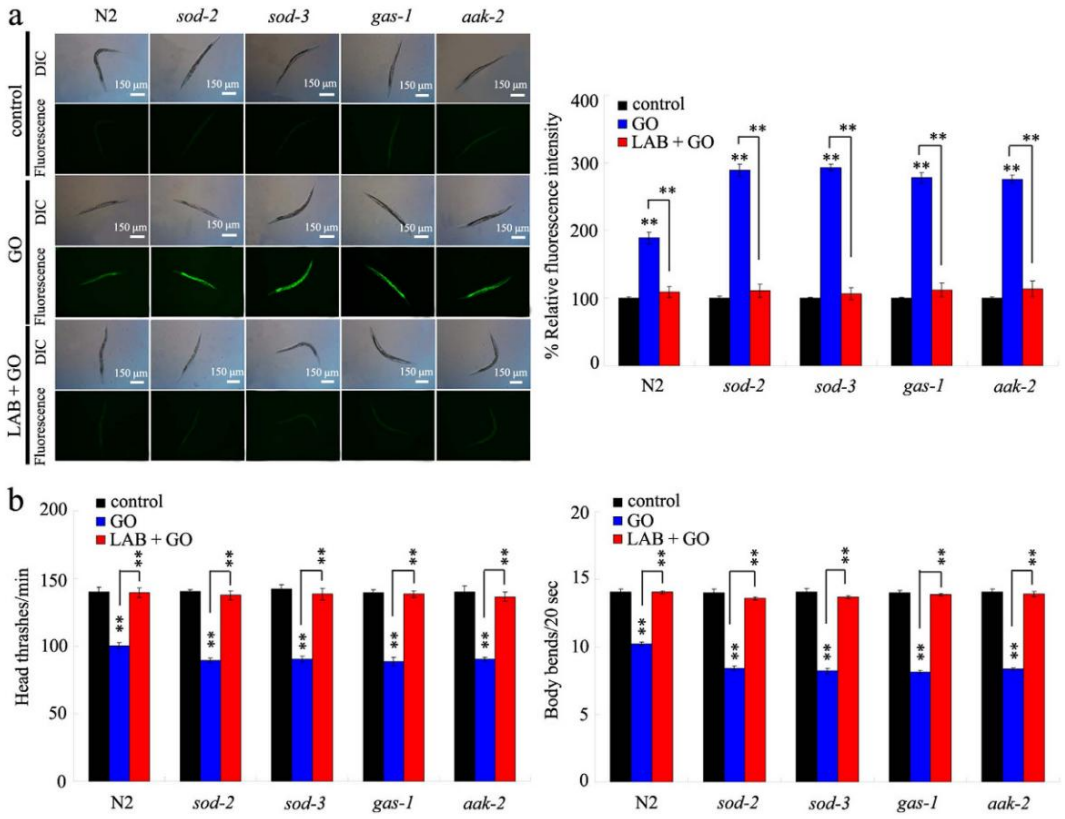


Figur 4. LAB-administration opretholdt normal intestinal permeabilitet i GO-eksponerede vildtype nematoder. **(a)** Resultater af Nile rød farvning. **(b)** Sammenligning af triglyceridindhold. **(c)** Sammenligning af genekspressionsmønstre for pkc-3, nhx-2 og par-6 gener. GO-eksponeringskoncentrationen var 100 mg/L. Den anvendte LAB-stamme var L. bulgaricus. L4-larver blev forbehandlet med LAB i 12 timer og derefter eksponeret for GO i 24 timer ved 20 °C. Søjlerne repræsenterer gennemsnit ± SEM **P < 0,01 vs. kontrol.



Figur 5. LAB-administration opretholdt den normale afføringsadfærd i GO-eksponerede vildtype nematoder. **(a)** Sammenligning af gennemsnitlig afføringscykluslængde. **(b)** Sammenligning af relativ fluorescensstørrelse af cellekroppen for AVL- eller DVB-neuroner. **(c)** Billeder, der viser AVL- og DVB-neuronerne. Asterisker angiver positionerne af AVL- eller DVB-neuroner. GO-eksponeringskoncentrationen var 100 mg/L. Den anvendte LAB-stamme var L. bulgaricus. L4-larver blev forbehandlet med LAB i 12 timer og derefter eksponeret for GO i 24 timer ved 20 °C. Søjlerne repræsenterer gennemsnit ± SEM **P < 0,01 vs. kontrol.

Machine Translated by Google
www.nature.com/videnskabeligerapporter/



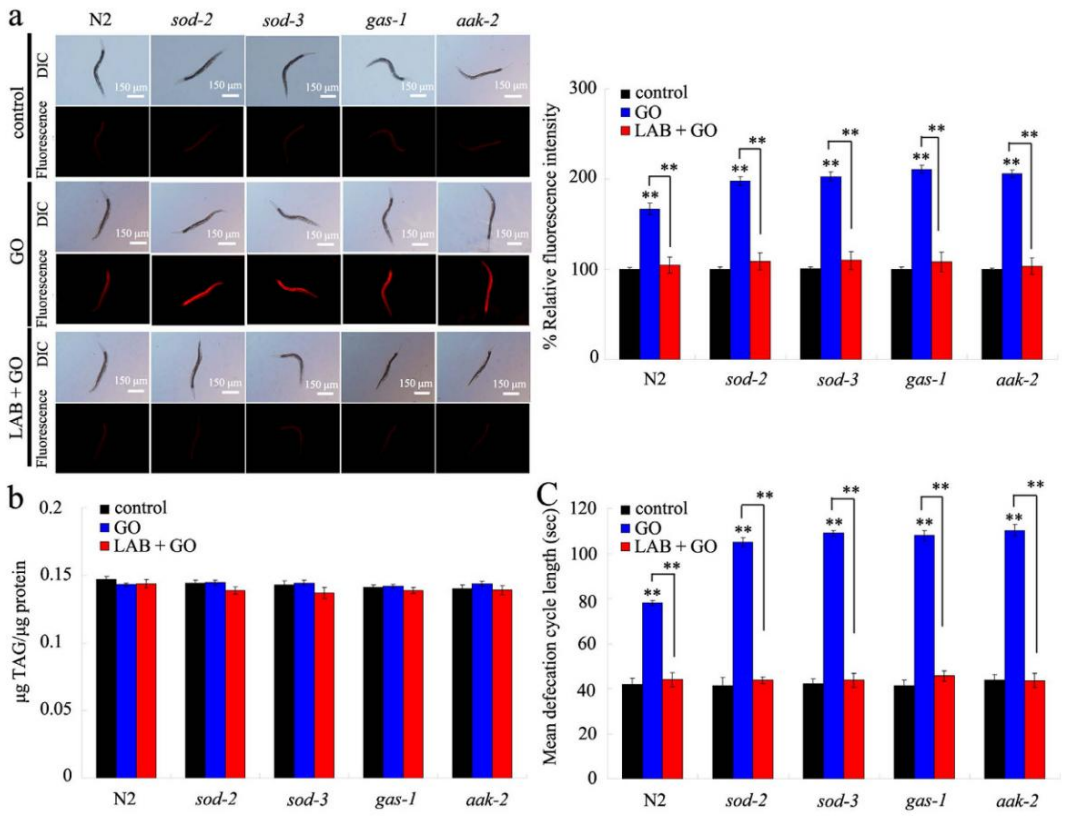
Figur 6. LAB-administration forhindrede toksiciteten af GO i nematoder med mutationer af det modtagelige gen. (a) LAB-administration forhindrede induktion af intestinal ROS-produktion induceret af GO-eksponering i nematoder med mutationer af det modtagelige gen. **(b)** LAB-administration forhindrede toksiciteten af GO på bevægelsesadfærd i nematoder med mutationer af det modtagelige gen. Bevægelsesadfærd blev vurderet ud fra endepunkterne hovedstød og kropsbøjning. GO-eksponeringskoncentrationen var 100 mg/L. Den anvendte LAB-stamme var L. bulgaricus. L4-larver blev forbehandlet med LAB i 12 timer og derefter eksponeret for GO i 24 timer ved 20 °C. Søjlerne repræsenterer gennemsnit ± SEM **P < 0,01 vs. kontrol (hvis ikke specifikt indikeret).

størrelsen af cellekroppen for AVL- eller DVB-neuroner induceret af GO (100 mg/L) eksponering (fig. 5b, c). LAB-forbehandling alene påvirkede ikke åbenlyst udviklingen af AVL- eller DVB-neuroner i vildtype nematoder (fig. 5b, c).

Administration med LAB forhindrede GO's toksicitet på nematoder med mutationer i det modtagelige gen. Tidligere undersøgelser har antydet, at mutationer i nogle gener, der kræves for at kontrollere oxidativ stress, såsom sod-2-, sod-3-, gas-1- eller aak-2-genet, forårsagede nematoders modtagelighed for GO-toksicitet35. I C. elegans koder sod-2- og sod-3-generne for de mitokondrielle mangan-superoxiddismutaser, gas-1-genet koder for en underenhed af mitokondriekompleks I, og aak-2-genet koder for en katalytisk alfa-underenhed af AMP-aktiveret proteinkinase. Mutation af sod-2-, sod-3-, gas-1- eller aak-2-genet førte til en mere alvorlig induktion af intestinal ROS-produktion og et fald i bevægelsesadfærd hos GO (100 mg/L) eksponerede nematoder sammenlignet med GO (100 mg/L) eksponeret vildtype N2 (fig. 6).
I modsætning hertil fandt vi, at LAB-forbehandling stadig effektivt kunne undertrykke induktionen af intestinal ROS-produktion og faldet i bevægelsesadfærd hos GO (100 mg/L) eksponerede sod-2, sod-3, gas-1 eller aak-2 mutante nematoder (fig. 6). Disse resultater antyder, at under sod-2, sod-3, gas-1 eller aak-2 mutationsbaggrund, kan LAB-forbehandling have en gavnlig effekt på at modvirke GO-toksiciteten i nematoder.

Administration med LAB forhindrede skaden fra GO-eksponering på tarmbarrieren hos nematoder med mutationer af det modtagelige gen. For at bestemme det cellulære grundlag for potentialet af LAB-forbehandling til at forebygge GO-toksicitet hos nematoder med mutationer af det modtagelige gen, undersøgte vi tarmpermeabiliteten i GO-eksponerede nematoder med mutationer af det modtagelige gen. Sod-2-, sod-3-, gas-1- og aak-2-mutanterne havde lignende Nile Red-farvningsresultater og triglyceridindhold som i vildtype N2-nematoder (fig. 7a,b), hvilket tyder på, at mutationer af sod-2-, sod-3-, gas-1- eller aak-2-genet ikke åbenlyst påvirkede tarmpermeabiliteten hos nematoder. Selvom de GO (100 mg/L) eksponerede sod-2-, sod-3-, gas-1- eller aak-2-mutanter havde et lignende triglyceridindhold som i vildtype

Machine Translated by Google
www.nature.com/videnskabeligerapporter/



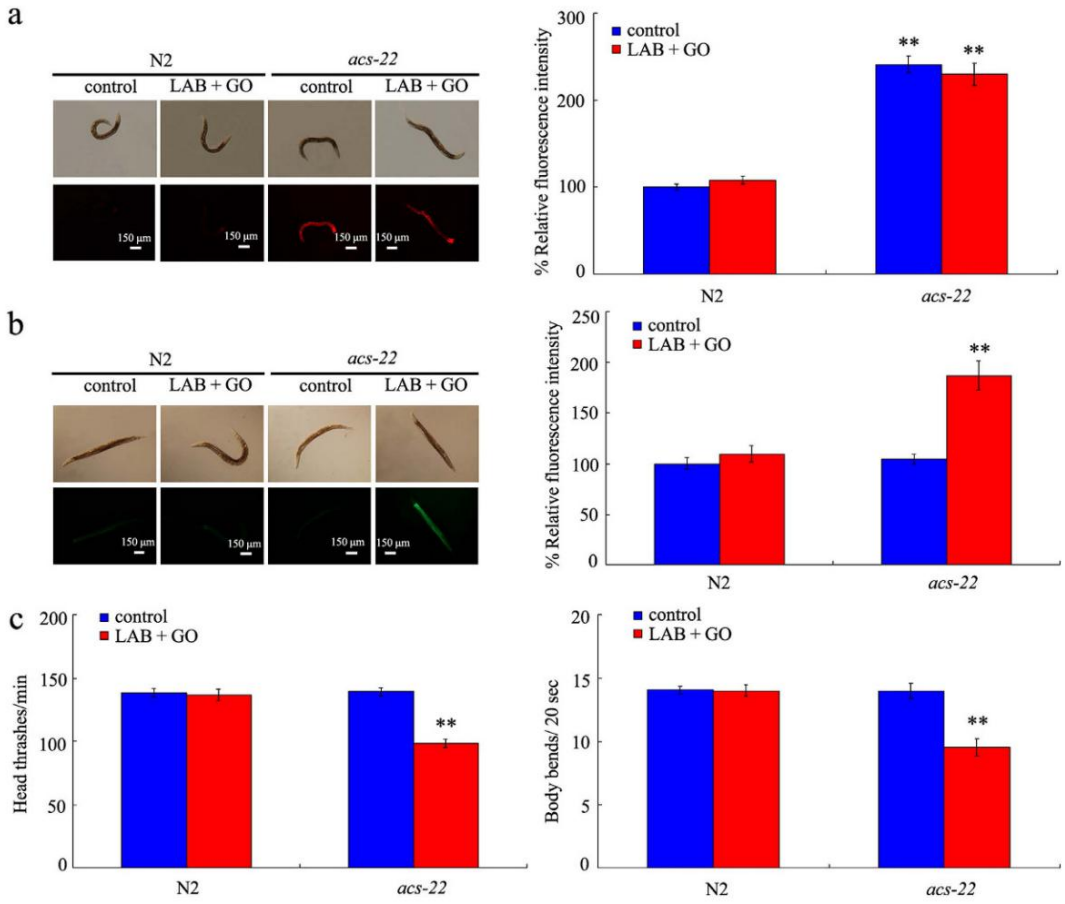
Figur 7. LAB-administration forhindrede skaden fra GO-eksponering på intestinal permeabilitet og afføringsadfærd hos nematoder med mutationer af det modtagelige gen. (a) Resultater af Nilrødt-farvning. **(b)** Sammenligning af triglyceridindhold. **(c)** Sammenligning af gennemsnitlig afføringscykluslængde. GO-eksponeringskoncentrationen var 100 mg/L. Den anvendte LAB-stamme var L. bulgaricus. L4-larver blev forbehandlet med LAB i 12 timer og derefter eksponeret for GO i 24 timer ved 20 °C. Søjlerne repræsenterer gennemsnit ± SEM **P < 0,01 vs. kontrol (hvis ikke specifikt indikeret).

N2-nematoder uden GO-eksponering, GO (100 mg/L) eksponerede sod-2-, sod-3-, gas-1- eller aak-2-mutanter, havde en mere forøget relativ fluorescensintensitet af Nile Red-signaler i tarmen end GO (100 mg/L) eksponerede vildtype N2-nematoder (fig. 7a, b). I modsætning hertil fandt vi yderligere, at LAB-forbehandling signifikant kunne hæmme stigningen i relativ fluorescensintensitet af Nile Red-signaler i tarmen hos GO (100 mg/L) eksponerede sod-2-, sod-3-, gas-1- eller aak-2-mutanter (fig. 7a, b).

Administration med LAB forhindrede skaden fra GO-eksponering på afføringsadfærd hos nematoder med mutationer i det modtagelige gen. For yderligere at bestemme det cellulære grundlag for potentialet af LAB-forbehandling til at forebygge GO-toksicitet hos nematoder med mutationer i det modtagelige gen, undersøgte vi også afføringsadfærden hos GO-eksponerede nematoder med mutationer i det modtagelige gen. Mutanterne sod-2, sod-3, gas-1 og aak-2 havde en lignende gennemsnitlig afføringscykluslængde som dem i vildtype N2-nematoder (fig. 7c), hvilket tyder på, at mutationer af sod-2, sod-3, gas-1 eller aak-2 genet påvirkede ikke mærkbart nematoders afføringscyklus. Mutanterne eksponeret for sod-2, sod-3, gas-1 eller aak-2 havde en længere gennemsnitlig afføringscykluslængde end vildtype-N2-nematoder eksponeret for GO (100 mg/L) (fig. 7c). I modsætning hertil kunne LAB-forbehandling signifikant undertrykke stigningen i gennemsnitlig afføringscykluslængde hos GO (100 mg/L) eksponeret for sod-2, sod-3, gas-1 eller aak-2. mutanter (fig. 7c).

Effekter af *acs-22*- mutation på gavnlige virkninger af LAB-administration mod GO-toksicitet. I C. elegans koder acs-22-genet for et protein, der er homologt med pattedyrs FATP4 (fedtsyretransportprotein 4), en nøglefaktor involveret i dannelsen af stratum corneum-barrieren47. Efter eksponering fandt vi, at GO signifikant reducerede ekspressionsniveauet af acs-22-genet sammenlignet med kontrol (fig. S4). I modsætning hertil kunne LAB-forbehandling opretholde den normale ekspression af acs-22-genet i nematoder eksponeret for GO (fig. S4). Hos nematoder inducerede mutation af acs-22-genet en signifikant stigning i den relative fluorescensintensitet af Nile Red-signaler i dyrenes tarm (fig. 8a). I modsætning hertil reducerede mutation af acs-22 genet ændrede ikke tydeligvis triglyceridindholdet (data ikke vist), inducerede den signifikante intestinale

Machine Translated by Google
www.nature.com/videnskabeligerapporter/



Figur 8. Effekter af acs-22-mutation på gavnlige virkninger af LAB-administration mod GO-toksicitet. (a) Effekter af acs-22-mutation på gavnlige virkninger af LAB-administration mod GO-induceret forøgelse af intestinal permeabilitet som indikeret af Nile Red-farvningsresultater. **(b)** Effekter af acs-22-mutation på gavnlige virkninger af LAB-administration mod GO-induceret intestinal ROS-produktion. **(c)** Effekter af acs-22 mutation på gavnlige virkninger af LAB-administration mod GO-induceret fald i bevægelsesadfærd. GO-eksponeringskoncentrationen var 100 mg/L. Den anvendte LAB-stamme var L. bulgaricus. L4-larver blev forbehandlet med LAB i 12 timer og derefter eksponeret for GO i 24 timer ved 20 °C. Søjlerne repræsenterer middelværdier ± SEM **P < 0,01 vs. N2.

ROS-produktion (fig. 8b) og påvirker dyrs bevægelsesadfærd (fig. 8c). Disse resultater antyder mulig involvering af acs-22-genet i kontrollen af tarmpermeabilitet hos nematoder.

Desuden kunne vi efter LAB-administration stadig observere en signifikant stigning i den relative fluorescensintensitet af Nile Red-signaler i tarmen, induktion af intestinal ROS-produktion og et fald i bevægelsesadfærd hos GO-eksponerede acs-22-mutantnematoder (fig. 8). LAB-administration ændrede imidlertid ikke triglyceridindholdet i acs-22-mutanten eksponeret for GO (data ikke vist). Derfor kan de gavnlige virkninger af LAB-administration mod GO-toksicitet være afhængige af funktionen af ACS-22. Hos nematoder kan LAB-administration udøve sine gavnlige virkninger på at opretholde normal intestinal permeabilitet ved at påvirke funktionen af ACS-22.

Diskussion

I dette studie undersøgte vi de mulige gavnlige virkninger af LAB-behandling i reduktionen af GO-toksicitet in vivo. I betragtning af C. elegans' vigtige bidrag til nanotoksikologiske studier5 anvendte vi den alternative ikke-pattedyrs toksicitetsassaymodel for C. elegans som in vivo vurderingssystem.

I betragtning af de mange gavnlige virkninger af L. bulgaricus på organismer, såsom undertrykkelse af inflammation og gastrointestinal velvære48,49, valgte vi L. bulgaricus som test-LAB-bakterier. I den foreliggende undersøgelse valgte vi primært tarmens ROS-produktion og bevægelsesadfærd som endepunkter for toksicitetsvurderingen for at afspejle funktionerne af henholdsvis primære og sekundære målrettede organer. For at evaluere funktionen af sekundære målrettede organer valgte vi ikke endepunktet for yngelstørrelse, fordi fodring med LAB kan forårsage, at de lagte æg klækkes og arresteres som L1-larver50. I denne undersøgelse undersøgte vi virkningerne af LAB-forbehandling på GO-toksicitet for at bestemme den mulige forebyggende funktion af LAB på GO-toksicitet hos nematoder.

Machine Translated by Google
www.nature.com/videnskabeligerapporter/

Hos C. elegans blev det rapporteret, at LAB beskyttede dyr mod enterotoksigen Escherichia coli-forårsaget død ved at hæmme patogenets enterotoksin-genekspression51. En af de vigtige cellulære mekanismer for GO-toksicitet er, at GO-eksponering potentielt kan inducere den betydelige ROS-produktion17,18. I den foreliggende undersøgelse viser vi yderligere, at LAB-forbehandling effektivt kan forhindre toksiciteten af GO-eksponering ved at inducere intestinal ROS-produktion og mindske bevægelsesadfærd hos nematoder (fig. 2). Vores data bekræftede funktionen af LAB-behandling i at forhindre nematoder i at blive skadet af oxidativ stress52. Desuden tyder vores resultater på, at LAB-forbehandling potentielt kan opretholde de normale funktioner i både primære og sekundære målrettede organer i GO-eksponerede nematoder.

Det ændrede translokationsmønster af GO i LAB-forbehandlede nematoder antyder den centrale cellulære mekanisme for de gavnlige virkninger af LAB-forbehandling mod GO-toksicitet. Nematoder uden LAB-forbehandling udviste distribution af GO i både primære og sekundære målrettede organer; nematoder med LAB-forbehandling viste dog distribution af GO primært i svælg og tarm (fig. 3). De afgørende cellulære mekanismer for GO-toksicitet er den direkte kontaktinteraktion mellem GO og cellemembranen15,16. Vores resultater tyder på, at LAB-forbehandling kan blokere translokationen af GO til de sekundære målrettede organer gennem tarmbarrieren i nematoder. Yderligere eksperimentelle beviser understøttede denne antagelse. LAB-forbehandling opretholdt den normale intestinale permeabilitet i GO-eksponerede vildtype nematoder (fig. 4a,b). Især forhindrede LAB-forbehandling dysregulering af gener involveret i kontrollen af tarmutvikling induceret af GO-eksponering i nematoder (fig. 4c). Disse resultater tyder på, at LAB-forbehandling kan blokere biotilgængeligheden af GO for celler, såvel som den mulige ladningsoverførsel fra GO til celler, i nematoders krop ved at opretholde den normale tarmpermeabilitet. Disse data understøtter potentialet for LAB-behandling i vedligeholdelse af gastrointestinal velvære, som tidligere er rapporteret49. Det vil sige, at LAB-forbehandling kan være nyttig til at forhindre skaden fra GO-eksponering på tarmudviklingen, som tidligere observeret hos nematoder og mus14,37. I modsætning hertil kan hæmningen af ROS-produktion induceret af GO-eksponering være et indirekte resultat af LAB-forbehandling. Derudover, i betragtning af at LAB-forbehandling effektivt kan undertrykke translokationen af GO til reproduktionsorganerne hos nematoder (fig. 3), antyder vores resultater, at LAB-forbehandling kan undertrykke biotilgængeligheden af GO for kimceller i reproduktionsorganerne og hæmme den genotoksicitet, der potentielt kan induceres af GO i nematoder.

Tidligere undersøgelser har identificeret nogle modtagelige gener, såsom sod-2, sod-3, gas-1 og aak-2, for GO-toksicitet i nematoder35. Nogle af disse gener koder for det molekylære reguleringsmaskineri for oxidativ stress. For eksempel koder gas-1-genet for en underenhed af mitokondriekompleks I i nematoder. Tidligere undersøgelser har antydet, at behandling med antioxidanter såsom E-vitamin eller paeonol med funktionen mod oxidativ skade kan hæmme toksiciteten af ENM'er såsom Al2O3-NP'er eller MWCNT'er40,41. Under en sådan genetisk baggrund kan de normalt anvendte antioxidanter, såsom E-vitamin, imidlertid ikke udøve de forventede gavnlige virkninger mod GO-toksicitet (data ikke vist). Især behandling med høje doser af visse antioxidanter, såsom E-vitamin, kan have negative virkninger på organismer40,53. Interessant nok fandt vi, at LAB-forbehandling også effektivt kunne forhindre skader fra GO-eksponering på både de primære og sekundære målrettede organer i sod-2-, sod-3-, gas-1- eller aak-2-mutanter (fig. 6).

Den centrale cellulære mekanisme bag de observerede gavnlige virkninger af LAB-forbehandling mod GO-toksicitet kan også skyldes opretholdelsen af intestinal permeabilitet i GO-eksponerede sod-2-, sod-3-, gas-1- eller aak-2-mutanter. Vi observerede, at den normale intestinale permeabilitet i GO-eksponerede sod-2-, sod-3-, gas-1- eller aak-2-mutanter kunne opretholdes godt ved LAB-forbehandling (fig. 7a, b). Tidligere undersøgelser har også antydet, at administration med LAB kan øge levetiden for nematoder52. Disse resultater antyder yderligere, at etablering af en blokering mellem GO og målrettede organer kan være en meget effektiv strategi mod GO-toksicitet under deres langvarige eksponering. Tidligere undersøgelser har antydet, at PEGylering kun delvist kan forbedre biokompatibiliteten af kulstofbaserede ENM'er hos mus efter langvarig (2 måneders) eksponering54. Med hensyn til den molekylære mekanisme bag de observerede gavnlige virkninger af LAB-forbehandling mod GO-toksicitet, antager vi, at LAB-forbehandling kan udøve sine gavnlige virkninger på at opretholde tarmpermeabiliteten og hæmme GO-toksicitet ved at påvirke funktionen af ACS-22 i nematoder (fig. 8). Derfor bør den kombinerede anvendelse af effektiv farmakologisk administration og kemisk overflademodifikation nøje overvejes for at forhindre den mulige toksicitet af specifikke ENM'er på organismer.

Udover at opretholde tarmpermeabilitet blev det også observeret, at LAB-forbehandling havde en funktion i at opretholde normal afføringsadfærd hos vildtype-nematoder (fig. 5a). Den mulige cellulære mekanisme bag dette kan også skyldes opretholdelsen af tarmpermeabilitet hos nematoder, og en sådan mekanisme kan yderligere beskytte AVL- og DVB-neuronerne mod skader fra GO-eksponering (fig. 5b, c). AVL-neuroner i hovedet og DVB-neuroner i halen er nødvendige for at kontrollere afføringsadfærd hos nematoder25. Under den modtagelige genetiske baggrund observerede vi yderligere opretholdelsen af normal afføringsadfærd hos nematoder (fig. 7c). Derfor kan den gavnlige rolle af LAB-forbehandling mod GO-toksicitet i det mindste skyldes de kombinerede effekter på tarmpermeabilitet og afføringsadfærd hos nematoder.

Konklusionen er, at LAB-forbehandling effektivt kan undertrykke toksiciteten af GO-eksponering på funktionen af både primære og sekundære målrettede organer i nematoder. En af de vigtigste cellulære mekanismer for de gavnlige virkninger af LAB-forbehandling er opretholdelsen af normal intestinal permeabilitet hos GO-eksponerede nematoder. En anden cellulær mekanisme for de gavnlige virkninger af LAB-forbehandling er opretholdelsen af normal afføringsadfærd hos GO-eksponerede nematoder. De kombinerede virk

Machine Translated by Google
www.nature.com/videnskabeligerapporter/

Påvirkningen af tarmpermeabilitet og afføringsadfærd ved LAB-forbehandling forhindrede translokationen af GO til de sekundære målrettede organer eller biotilgængeligheden af GO til celler i kroppen gennem tarmbarrieren i nematoder. En af de vigtige molekylære mekanismer for de gavnlige virkninger af LAB-forbehandling er, at LAB kan udøve sine gavnlige virkninger mod GO-toksicitet ved at påvirke funktionen af ACS-22 i nematoder. Mere interessant fandt vi, at de gavnlige virkninger af LAB-forbehandling mod GO-toksicitet også kunne observeres i nematoder med mutationer af modtagelige gener.

Metoder

Reagenser og præparater af GO. GO blev fremstillet ud fra naturligt grafitpulver ved hjælp af den modificerede Hummers metode55,56. Grafit (2 g) og natriumnitrat (1 g) blev tilsat en 250 ml kolbe. Efter tilsætning af koncentreret H2SO4 (50 ml) på is blev KMnO4 (7 g) tilsat blandingen. Igen blev 90 ml H2O langsomt dryppet ned i pastaen for at forårsage en temperaturstigning til 70 °C, efter at blandingens temperatur var steget til 35 °C. Efter omrøring af den fortyndede suspension ved 70 °C i yderligere 15 minutter blev suspensionen behandlet med en blanding af 7 ml 30 % H2O2 og 55 ml H2O. Den resulterende varme suspension blev filtreret for at opnå en gulbrun filterkage. Filterkagen blev vasket tre gange med en opløsning af 3 % HCl, efterfulgt af tørring ved 40 °C i 24 timer. GO blev endelig opnået ved ultralydbehandling af den færdigfremstillede grafitoxid i vand i 1 time.

GO blev sonikeret i 30 minutter (40 kHz, 100 W) og dispergeret i K-medium for at fremstille stamopløsningen (1 mg/ml). Stamopløsningen blev fortyndet til den anvendte koncentration (100 mg/L) med K-medium lige før eksponering37. Alle andre kemikalier blev indkøbt fra Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Karakterisering af GO. GO blev karakteriseret ved hjælp af transmissionselektronmikroskopi (TEM, JEM-200CX, JEOL, Japan), AFM (SPM-9600, Shimadzu, Japan) og Ramanspektroskopi (Renishaw Invia Plus laser Raman-spektrometer, Renishaw, Storbritannien). Zeta-potentialet blev analyseret med Nano Zetasizer ved hjælp af en dynamisk lysspredningsteknik (DLS). For at udføre AFM-måling blev et par dråber af GO-suspensionen pipetteret på Si-substrater, og derefter blev substraterne lufttørret og placeret under AFM-spidsen til morfologianalyse. Elementarsammensætningsanalyse blev udført med XPS (AXIS Ultra instrument, Kratos, Storbritannien).

Forberedelse af *C. elegans* -stamme. De nematoder, der blev anvendt i den foreliggende undersøgelse, var vildtype N2 og mutanter af sod-2(ok1030), sod-3(gk235), gas-1(fc21), aak-2(ok524) og acs-22(tm3236). Nogle stammer blev oprindeligt indhentet fra Caenorhabditis Genetics Center (finansieret af NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440)). Nematoder blev vedligeholdt på nematodevækstmedium (NGM)-plader podet med Escherichia coli OP50 ved 20 °C som beskrevet21. Drægtige nematoder blev vasket af pladerne over i centrifugerør og lyseret med en blegeblanding (0,45 M NaOH, 2% HOCl). Alderssynkrone populationer af L4-larver blev opnået som beskrevet57. Eksponering for GO blev udført fra dag 1 som voksen i 24 timer i sterile vævskulturplader med 12 brønde ved 20 °C i nærvær af fø De eksponerede nematoder blev brugt til toksicitetsvurdering ved hjælp af intestinal ROS-produktion og bevægelsesadfærd som slutpunkter.

LAB-administration. Lactobacillus bulgaricus-bakterier blev dyrket i de Man, Rogosa og Sharpe (MRS) medium (Difco, Detroit, MI) ved 37 °C i 24 timer, og bakterierne blev podet på modificerede NGM-plader (peptonfri NGM). For at undersøge de forebyggende virkninger af LAB på GO's toksicitet blev L4-larver forbehandlet på modificerede NGM-plader fodret med pletter af L. bulgaricus i 12 timer ved 20 °C. Derefter blev nematoderne eksponeret for GO ved at overføre de undersøgte nematoder fra de modificerede NGM-plader fodret med L. bulgaricus til brønde i sterile vævskulturplader indeholdende GO ved 20 °C. Efter 24 timer blev nematoderne brugt til toksicitetsvurderingen.

Toksicitetsvurdering. Metoden til ROS-produktion blev udført som beskrevet58,59. De undersøgte nematoder blev overført til 1 ÿM 5ÿ,6ÿ-chlormethyl-2ÿ,7ÿdichlordihydro-fluoresceindiacetat (CM-H2DCFDA; Molecular Probes) i sterile vævskulturplader med 12 brønde for at præinkubere i 3 timer ved 20 °C i mørke, og derefter monteret på 2% agarpuder til undersøgelse ved 488 nm excitationsbølgelængde og 510 nm emissionsfilter med et laserscanningskonfokalmikroskop (Leica, TCS SP2, Bensheim, Tyskland). Den relative fluorescensintensitet af tarmen blev semi-kvantificeret, og den semi-kvantificerede ROS blev udtrykt som relative fluorescensenheder (RFU). Tredive nematoder blev undersøgt pr. behandling, og tre replikater blev udført.

Nematoders bevægelsesadfærd blev vurderet ud fra endepunkterne for hovedfornemmelse og kropsbøjning som beskrevet60,61. En hovedfornemmelse blev defineret som en ændring i bøjningsretningen midt på kroppen, og en kropsbøjning blev talt som en ændring i retningen af den del af nematoden, der svarer til den bageste bulb af svælget langs y-aksen, forudsat at nematoden bevægede sig langs x-aksen. Tredive nematoder blev undersøgt pr. behandling, og der blev udført tre replikater.

Fordeling af GO i nematoder. For at undersøge fordelingen af GO i nematoder blev Rho B påført GO ved at blande Rho B-opløsning (1 mg/ml, 0,3 ml) med en vandig suspension af GO (0,1 mg/ml, 5 ml) grundlæggende som tidligere beskrevet35. Ubundet Rho B blev fjernet ved dialyse mod destilleret vand over 72 timer. Det resulterende GO-Rho B blev opbevaret ved 4 °C. De undersøgte nematoder blev inkuberet med

Machine Translated by Google
www.nature.com/videnskabeligerapporter/

GO-Rho B blev behandlet i 3 timer og vasket med M9-buffer. Nematoder blev derefter observeret under et laserscanningskonfokalmikroskop (Leica, TCS SP2, Bensheim, Tyskland). Den relative fluorescensintensitet af GO-Rho B i svælg og tarm (de primære målorganer) og spermatheca (de sekundære målorganer) blev undersøgt. Ti nematoder blev undersøgt pr. behandling, og der blev udført tre replikater. Rho B blev brugt som kontrol.

Nile Red-farvning. Metoderne blev udført som tidligere beskrevet35. Nile Red (Molecular Probes, Eugene, OR) blev opløst i acetone for at producere en 0,5 mg/ml stamopløsning og opbevaret ved 4 °C.
Stamopløsningen blev frisk fortyndet i 1× PBS til 1 ÿg/ml, og 150 ÿl af den fortyndede opløsning blev brugt til Nile Red-farvning. 30 nematoder blev undersøgt pr. behandling, og der blev udført tre replikater.

Analyse af triglyceridindhold. Lipid fra nematoder blev ekstraheret ved hjælp af den tidligere beskrevne metode62. Triglyceridindholdet blev målt ved hjælp af et enzymatisk kit (Wako Triglyceride E-test, Wako Pure Chemical Ltd., Osaka, Japan). Ti replikater blev udført.

Analyse af afføringsadfærd og fluorescerende billeder af neuroner, der kontrollerer afføringsadfærden. Metoden blev udført som tidligere beskrevet63. For at analysere den gennemsnitlige afføringscykluslængde blev det enkelte dyr undersøgt i et fast antal cyklusser, og en cyklusperiode blev defineret som intervallet mellem initiering af to på hinanden følgende posteriore kropsvæg-muskelkontraktionstrin. Tredive nematoder blev anvendt til hvert assay af den gennemsnitlige afføringscykluslængde, og tre replikater blev udført.

Fluorescerende billeder af AVL- og DVB-neuroner, der kontrollerer afføringsadfærd, blev taget med et Zeiss Axiocam MRm-kamera på et Zeiss Axioplan 2 Imaging System ved hjælp af SlideBook-software (Intelligent Imaging Innovations). Billeder blev erhvervet med et Quantix-kølet charge-coupled device (CCD)-kamera, og belysningen blev leveret af en 175 W xenonbuelampe og GFP-filtersæt. De relative størrelser af fluorescerende puncta for cellekroppe af AVL- og DVB-neuroner blev målt som den maksimale radius for analyserede fluorescerende puncta. De relative størrelser af fluorescerende puncta for cellekroppe af AVL- og DVB-neuroner blev undersøgt i mindst 20 nematoder, og tre replikater blev udført.

Omvendt transkription og kvantitativ realtids-polymerasekædereaktion (PCR). Total RNA blev ekstraheret ved hjælp af RNeasy Mini Kit (Qiagen). Renhed og koncentration af RNA blev evalueret ved hjælp af OD260/280 i et spektrofotometer. Total RNA blev reverstranskriberet ved hjælp af PrimeScript RT reagenskittet (Takara, Otsu, Shiga, Japan). Efter cDNA-syntese blev realtids-PCR udført ved hjælp af SYBR Premix Ex Taq™ (Takara) til amplifikation af PCR-produkterne. tba-1-genet blev valgt som referencegen. Alle reaktioner blev udført i triplikat med de samme cDNA-prøver. Den relative kvantificering af målrettede gener i sammenligning med reference-tba-1-genet, der koder for et tubulinprotein, blev bestemt, og de endelige resultater blev udtrykt som det relative ekspressionsforhold mellem målrettet gen og referencegen. De designede primere for målrettede gener og reference-tba-1-genet blev vist i tabel S1.

Statistisk analyse. Alle data i denne artikel er udtrykt som middelværdier ± standardfejl for middelværdien (SEM). Grafer blev genereret ved hjælp af Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA). Statistisk analyse blev udført ved hjælp af SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Forskelle mellem grupperne blev bestemt ved hjælp af variansanalyse (ANOVA). Sandsynlighedsniveauer på 0,05 og 0,01 blev betragtet som statistisk signifikante.

Referencer

1. Geim, AK Grafen: status og udsigter. Science **324,** 1530–1534 (2009).
2. Liu, Z., Robinson, JT, Sun, X. & Dai, H. Pegyleret nanografenoxid til levering af vanduopløselige kræftlægemidler. J. Am. Chem. Soc. **130,** 10876-10877 (2008).
3. Bitounis, D., Ali-Boucetta, H., Hong, BH, Min, D. & Kostarelos, K. Udsigter og udfordringer for grafen i biomedicinsk ansøgninger. Adv. Mater. **25,** 2258–2268 (2013).
4. Akhavan, O., Ghaderi, E. & Rahimi, K. Negative virkninger af grafen inkorporeret i TiO2- fotokatalysator på bittesmå dyr. under bestråling af sollys. J. Mater. Chem. **22,** 23260–23266 (2012).
5. Yang, K., Li, Y., Tan, X., Peng, R. & Liu, Z. Grafens og dets funktionaliserede derivaters adfærd og toksicitet i biologiske systemer. Small **9,** 1492–1503 (2013).
6. Zhao, Y.-L., Wu, Q.-L., Li, Y.-P. & Wang, D.-Y. Translokation, overførsel og in vivo sikkerhedsevaluering af konstruerede nanomaterialer i den alternative ikke-pattedyrs toksicitetsassaymodel af nematoden Caenorhabditis elegans. RSC Adv. **3,** 5741–5757 (2013).
7. Yuan, J. et al. Cytotoksicitetsevaluering af oxiderede enkeltvæggede kulstofnanorør og grafenoxid på humant hepatom. HepG2-celler: en iTRAQ-koblet 2D LC-MS/MS proteomanalyse. Toxicol. Sci. **126,** 149–161 (2012).
8. Qu, G. et al. Grafenoxid inducerer Toll-lignende receptor 4 (TLR4)-afhængig nekrose i makrofager. ACS Nano **7,** 5732–5745 (2013).
9. Li, Y.-P. et al. MikroRNA'ers respons på in vitro-behandling med grafenoxid. ACS Nano **8,** 2100–2110 (2014).
10. Li, B. et al. Biodistribution og pulmonal toksicitet af intratrakealt instilleret grafenoxid hos mus. NPG Asia Mater. **5,** e44 (2013).
11. Akhavan, O., Ghaderi, E., Hashiemi, E. & Akbari E. Dosisafhængige effekter af grafenoxid i nanoskala på reproduktion pattedyrs evner. Carbon **95,** 309–317 (2015).
12. Akhavan, O., Ghaderi, E., Emamy. H. & Akhavan F. Genotoksicitet af grafen-nanobånd i humane mesenkymale stamceller. Kulstof **54,** 419–431 (2013).
13. Akhavan, O., Ghaderi, E. & Emamy H. Ikke-toksiske koncentrationer af PEGylerede grafen-nanobånd til selektiv kræftcelleanalyse billeddannelse og fototermisk terapi. J. Mater. Chem. **22,** 20626–20633 (2012).

14. Fu, C. et al. Effekter af grafenoxid på udviklingen af museafkom i diegivningsperioden. Biomaterials **40,** 23–31 (2015).
15. Akhavan, O. & Ghaderi E. Toksicitet af grafen og grafenoxid-nanovægge mod bakterier. ACS Nano **4,** 5731–5736 (2010).
16. Hu, W. et al. Protein-koronamedieret afbødning af cytotoksicitet af grafenoxid. ACS Nano **5,** 3693–3700 (2011).
17. Chang, Y. et al. In vitro-toksicitetsevaluering af grafenoxid på A549-celler. Toxicol. Lett. **200,** 201–210 (2011).
18. Akhavan, O., Ghaderi, E. & Akhavan, A. Størrelsesafhængig genotoksicitet af grafen-nanoblodplader i humane stamceller. Biomaterialer **33,** 8017–8025 (2012).
19. Akhavan, O., Ghaderi, E. & Esfandiar, A. Indpakning af bakterier med grafen-nanoplader til isolering fra miljøet og reaktivering. ved sonikering og inaktivering ved nær-infrarød bestråling. J. Phys. Chem. B **115,** 6279–6288 (2011).
20. Hashemi, E. et al. Cyto- og genotoksicitet af grafenoxid og reducerede grafenoxidlag på sædceller. RSC Adv. **4,** 27213–27223 (2014).
21. Brenner, S. Genetikken hos Caenorhabditis elegans. Genetik **77,** 71–94 (1974).
22. Antoshechkin, I. & Sternberg, PW Den alsidige orm: genetiske og genomiske ressourcer til forskning i Caenorhabditis elegans. Nat. Rev. Genet. **8,** 518–532 (2007).
23. Leung, MCK et al. Caenorhabditis elegans: en ny model inden for biomedicinsk og miljømæssig toksikologi. Toxicol. Sci. **106,** 5–28 (2008).
24. Scharf, A., Piechulek, A. & von Mikecz, A. Effekt af nanopartikler på den biokemiske og adfærdsmæssige aldringsfænotype hos nematoden Caenorhabditis elegans. ACS Nano **7,** 10695–10703 (2013).
25. Zhao, Y.-L., Wu, Q.-L., Tang, M. & Wang, D.-Y. Den in vivo underliggende mekanisme for dannelse af restitutionsrespons i nanotitandioxid-eksponeret Caenorhabditis elegans efter overførsel til normal tilstand. Nanomedicin: Nanotechnol. Biol. Med. **10,** 89–98 (2014).
26. Zhao, Y.-L., Wang, X., Wu, Q.-L., Li, Y.-P. & Wang, D.-Y. Translokation og neurotoksicitet af CdTe-kvantepunkter i RME-motorneuroner i nematoden Caenorhabditis elegans. J. Hazard. Mater. **283,** 480–489 (2015).
27. Zhao, Y.-L. et al. Eksponering for kvanteprikker ændrer både udvikling og funktion af D-type GABAerge motorneuroner i nematoden Caenorhabditis elegans. Toxicol. Res. **4,** 399–408 (2015).
28. Wu, Q.-L. et al. Den afgørende rolle af biologisk barriere ved de primære målrettede organer i kontrol af translokation og toksicitet af multi-Væggede kulstofnanorør i nematoden Caenorhabditis elegans. Nanoscale **5,** 11166–11178 (2013).
29. McGhee, JD C. elegans tarmen, WormBook, red. C. elegans forskningsfællesskab, WormBook, doi: 10.1895/ormebog.1.133.1 (2007).
30. Zanni, E. et al. Grafit-nanoblodplader og Caenorhabditis elegans: indsigt fra en in vivo-model. Nano Lett. **12,** 2740–2744 (2012).
31. Zhao, Y.-L. et al. In vivo-translokation og toksicitet af flervæggede kulstofnanorør reguleres af mikroRNA'er. Nanoskala **6,** 4275–4284 (2014).
32. Zhao, Y.-L., Liu, Q., Shakoor, S., Gong, JR & Wang, D.-Y. Transgenerationel sikker egenskab ved nitrogendopet grafenkvante prikker og den underliggende cellulære mekanisme i Caenorhabditis elegans. Toxicol. Res. **4,** 270–280 (2015).
33. Cong, W. et al. Evaluering af fullerenols indflydelse på aldring og stressresistens ved brug af Caenorhabditis elegans. Biomaterialer. **42,** 78–86 (2015).
34. Zhang, W. et al. Afdækning af stressinducerede toksicitetsegenskaber af grafenoxid og den underliggende mekanisme. Adv. Mater. **24,** 5391–5397 (2012).
35. Wu, Q.-L., Zhao, Y.-L., Li, Y.-P. & Wang, D.-Y. Molekylære signaler, der regulerer translokation og toksicitet af grafenoxid i nematoden Caenorhabditis elegans. Nanoscale **6,** 11204–11212 (2014).
36. Wu, Q.-L., Zhao, Y.-L., Zhao, G. & Wang, D.-Y. mikroRNA'er, der kontrollerer in vivo-toksicitet fra grafenoxid i Caenorhabditis elegans. Nanomedicin: Nanoteknologi. Biol. Med. **10,** 1401–1410 (2014).
37. Wu, Q.-L. et al. Bidrag fra ændret permeabilitet af tarmbarrieren og afføringsadfærd til dannelse af toksicitet fra grafenoxid i nematoden Caenorhabditis elegans. Nanoscale **5,** 9934–9943 (2013).
38. Hu, W. et al. Protein-koronamedieret afbødning af cytotoksicitet af grafenoxid. ACS Nano **5,** 3693–3700 (2011).
39. Wu, Q.-L., Zhao, Y.-L., Fang, J.-P. & Wang, D.-Y. Immunrespons er påkrævet for at kontrollere in vivo translokation og kronisk toksicitet af grafenoxid. Nanoscale **6,** 5894–5906 (2014).
40. Yu, X.-M., Guan, X.-M., Wu, Q.-L., Zhao, Y.-L. & Wang, D.-Y. E-vitamin forbedrer de neurodegenerationsrelaterede fænotyper forårsaget af neurotoksicitet af Al2O3-nanopartikler i C. elegans. Toxicol. Res. **4,** 1269–1281 (2015).
41. Shu, C.-J. et al. Forbehandling med paeonol forhindrer bivirkningerne og ændrer translokationen af flerlags kulstof nanorør i nematoden Caenorhabditis elegans. RSC Adv. **5,** 8942–8951 (2015).
42. FAO/WHO (FN's fødevare- og landbrugsorganisation/Verdenssundhedsorganisationen). Retningslinjer for evaluering af probiotika i fødevarer. (2002) (Adgangsdata: 01/05/2002).
43. Ikeda, T., Yasui, C., Hoshino, K., Airkawa, K. & Nishikawa, Y. Indflydelse af mælkesyrebakterier på Caenorhabditis elegans' levetid og værtens forsvar mod Salmonella enterica serovar enteritidis. Appl. Environ. Microbiol. **73,** 6404–6409 (2007).
44. Lee, J. et al. Evaluering af probiotiske egenskaber hos nyligt isolerede Lactobacillus spp.: Immunmodulation og levetid. Int. J. Food Microbiol. **148,** 80–86 (2011).
45. Yang, R.-L. et al. Insulinsignalering regulerer toksiciteten af trafikrelateret PM2.5 på tarmudvikling og -funktion hos nematoden Caenorhabditis elegans. Toxicol. Res. **4,** 333–343 (2015).
46. Wu, Q.-L., Rui, Q., He, K.-W., Shen, L.-L. & Wang, D.-Y. UNC-64 og RIC-4, de plasmamembranassocierede SNARE-syntaksiner og SNAP-25, regulerer fedtlagring i nematoden Caenorhabditis elegans. Neurosci. Bull. **26,** 104–116 (2010).
47. Kage-Nakadai, E. et al. To meget langkædede fedtsyreacyl-CoA-syntetasegener, acs-20 og acs-22, spiller en rolle i kutikula. overfladebarriere i Caenorhabditis elegans. PLoS One **5,** e8857 (2010).
48. Kano, H., Kita, J., Makino, S., Ikegami, S. & Itoh, H. Oral administration af Lactobacillus delbrueckii-underarten bulgaricus OLL1073R-1 undertrykker inflammation ved at mindske interleukin-6-responser i en murin model af atopisk dermatitis. J Dairy Sci. **96,** 3525–3534 (2013).
49. Nova, E., Viadel, B., Wärnberg, J., Carreres, JE & Marcos, A. Gavnlige virkninger af et synbiotisk tilskud på selvopfattet gastrointestinal velvære og immuninflammatorisk status hos raske voksne. J. Med. Food **14,** 79–85 (2011).
50. Fasseas, MK, Dasseas, C., Mountzouris, KC & Syntichaki, P. Virkninger af Lactobacillus salivarius, Lactobacillus reuteri og Pediococcus acidilactici på nematoden Caenorhabditis elegans inkluderer mulig antitumoraktivitet. Appl. MIcrobiol. Biotechnol. **97,** 2109–2118 (2013).
51. Zhou, M. et al. Lactobacillus zeae beskytter Caenorhabditis elegans mod enterotoksigen Escherichia coli-forårsaget død ved at hæmme enterotoksin-genekspression af patogenet. PLoS One **9,** e89004 (2014).
52. Grompone, G. et al. Den antiinflammatoriske Lactobacillus rhamnosus CNCM I-3690-stamme beskytter mod oxidativ stress og øger levetiden hos Caenorhabditis elegans. PLoS One **7,** e52493 (2012).
53. Li, Y.-P. et al. Høj koncentration af E-vitamin mindsker termosensation og termotaksi-læring og den underliggende mekanismer i nematoden Caenorhabditis elegans. PLoS One **8,** e71180 (2013).
54. Zhang, D. et al. Langtids hepatotoksicitet af polyethylenglycol-funktionaliserede flervæggede kulstofnanorør i mus. Nanoteknologi **21,** 175101 (2010).

Machine Translated by Google
www.nature.com/videnskabeligerapporter/

55. Hummers Jr., WS & Offerman, RE Fremstilling af grafitoxid. J. Am. Chem. Soc. **80,** 1339 (1958).
56. Kovtyukhova, NI et al. Lag-for-lag samling af ultratynde kompositfilm fra mikronstore grafitoxidark og polykationer. Chem. Mater. **11,** 771–778 (1999).
57. Donkin, S. & Williams, PL Indflydelse af udviklingsstadium, salte og fødevaretilstedeværelse på forskellige slutpunkter ved brug af Caenorhabditis elegans til test af akvatisk toksicitet. Environ. Toxicol. Chem. **14,** 2139–2147 (1995).
58. Liu, P.-D. et al. Eksponering for kviksølv forårsager dannelse af hanspecifikke strukturelle defekter ved at inducere oxidativ skade i nematoder. Ecotoxicol. Environ. Safety **79,** 90–100 (2012).
59. Wu, Q.-L., Zhao, Y.-L., Li, Y.-P. & Wang, D.-Y. Følsomme gener regulerer de negative virkninger af TiO2-NP'er ved forudsagte miljørelevante koncentrationer på nematoden Caenorhabditis elegans. Nanomedicin: Nanotechnol. Biol. Med. **10,** 1263–1271 (2014).
60. Rui, Q., Zhao, Y.-L., Wu, Q.-L., Tang, M. & Wang, D.-Y. Biosikkerhedsvurdering af titandioxid-nanopartikler i akut eksponeret nematode Caenorhabditis elegans med mutationer af gener, der kræves for oxidativ stress eller stressrespons. Chemosphere **93,** 2289–2296 (2013).
61. Li, Y.-H. et al. Induktion af kemotaksi til natriumchlorid og diacetyl- og termotaksisdefekter ved eksponering for mikrocystin-LR i nematoden Caenorhabditis elegans. J. Environ. Sci. **21,** 971–979 (2009).
62. Bligh, EG & Dyer, WJ En hurtig metode til total lipidekstraktion og -oprensning. Can. J. Biochem. Physiol. **37,** 911–917 (1959).
63. Zhao, Y.-L. et al. Transgenerationelle effekter af trafikrelateret finpartikeldannelse (PM2.5) på nematoden Caenorhabditis elegans. J. Hazard. Mater. **274,** 106–114 (2014).

Taksigelser

Nogle af de nematodestammer, der blev anvendt i dette studie, blev leveret af CGC, som er finansieret af NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440). Dette arbejde blev støttet af bevillinger fra National Basic Research Program of China (nr. 2011CB933404) og National Natural Science Foundation of China (nr. 81172698).

Forfatterbidrag

DW designede projektet. YZ, XY, RJ, RY og QR udførte eksperimenterne. DW skrev manuskriptet. Alle forfattere diskuterede resultaterne og gennemgik manuskriptet.

Yderligere oplysninger

Supplerende information findes vedlagt dette dokument på http://www.nature.com/srep

Konkurrerende økonomiske interesser: Forfatterne erklærer ingen konkurrerende økonomiske interesser.

Sådan citerer du denne artikel: Zhao, Y. et al. Mælkesyrebakterier beskytter Caenorhabditis elegans mod toksicitet af grafenoxid ved at opretholde normal intestinal permeabilitet under forskellige genetiske baggrunde. Sci. Rep. 5, 17233; doi: 10.1038/srep17233 (2015).

Dette værk er licenseret under en Creative Commons Attribution 4.0 International License. Billederne eller andet tredjepartsmateriale i denne artikel er inkluderet i artiklens Creative Commons-licens, medmindre andet er angivet i kreditlinjen. Hvis materialet ikke er inkluderet under Creative Commons-licensen, skal brugerne indhente tilladelse fra licenshaveren til at reproducere materialet. For at se en kopi af denne licens, besøg http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/